

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520091153033

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

心脏移植小鼠卵母细胞减数分裂进程中的
组蛋白乙酰化水平及线粒体分布的变化

Changes in histone acetylation and mitochondrial distribution
during oocyte meiotic maturation in the heart transplants
mouse

潘 睿

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩日期: 2012 年 06 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(齐忠权)课题(组)的研究成果,获得(齐忠权)课题(组)经费或实验室的资助,在(器官移植研究所)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

人类的心脏移植始于 1967 年,却在 80 年代初才得以正式应用于终末期心脏疾病的治疗。伴随着外科手术和免疫学科的不断发展和完善,人们已成功将多种类型的免疫抑制剂应用于移植术后以使移植物少受或免受机体免疫系统的攻击。然而,已上市的免疫抑制剂目前鲜见有关生殖生物学方面的研究,它们是否会对哺乳动物的卵母细胞造成损伤仍有待探讨。本研究发现:小鼠的卵母细胞在心脏移植术后在数量上有所减少,质量也有所降低;但通过与未给予药物的对照组相比发现,腹腔注射他克莫司(Tacrolimus, FK506)等免疫抑制剂对 C57BL/6(H-2^b)小鼠卵母细胞的数量和质量并没有显著的损伤。

线粒体作为重要的细胞器之一,承担着为卵母细胞成熟不断提供能量的重要作用,而组蛋白的乙酰化修饰属于真核细胞表观遗传修饰中的重要一类,对于小鼠卵母细胞的生长、成熟、受精乃至后续发育均可能有着十分重要的意义。本研究选取了 C57BL/6(H-2^b)小鼠卵母细胞减数分裂过程中的 3 个代表性时期,即生发泡期,第一次减数分裂中期,第二次减数分裂中期,通过细胞免疫荧光染色直观地观察了心脏移植小鼠卵母细胞(实验组)核心组蛋白上 5 个关键的赖氨酸位点(H3K14; H4K5, K8, K12, K16)的(去)乙酰化状态,并与对照组做了比较。同时又对这 3 个时期的卵母细胞进行了线粒体探针的标记,观察两组间可能存在的线粒体分布情况的差异。

本实验结果显示:(1)我们以对照组为参照,实验组不同于对照组的结果视为阳性,在小鼠卵母细胞减数分裂进程的三个特定时期中,在某些特定的赖氨酸位点(H4K5 和 H4K8)上,实验组和对照组的(去)乙酰化状态有所差异;(2)在小鼠卵母细胞减数分裂进程中,实验组和对照组的线粒体分布情况在 MI 期有差异。

关键词: 心脏移植, 小鼠卵母细胞, 线粒体, 组蛋白乙酰化

Abstract

The human heart transplants began in 1967, but in the early 80's to be used for end-stage heart disease treatments. With the development of surgical operation and immunology, many types of immunosuppressive agents has been successfully applied to graft after transplantation to protect it from the body's immune system attacks.

However, the biology research of the immunosuppressive agents that have been listed is uncommon , whether they will damage the mammalian oocyte remains to be explored. This study found that: the oocytes of heart transplants mouse are reducing in number and the quality are also decreased; but compared to the controls not given a drug, the oocytes of B6 mouse with intraperitoneal injection of FK506 (Tacrolimus, FK506) and other immunosuppressive agents have no significant damage on quantity and quality .

Mitochondria as a kind of important organelles provides energy to the oocytes , and histone acetylation plays an important role in eukaryotic cells as a class of epigenetic modification , both of them have very important sense on the growth, maturation, fertilization and subsequent embryo development of mouse oocytes. This study chose three considerable typical development stages (GV, MI, MII stages) during meiosis of mice oocyte, observed the global profiles of histones H3 and H4 acetylation (the changes of histone at H3K9 ; H4K5, K8, K12 and K16) in oocytes of heart transplants mice through immunostaining. We also obtained the distribution status of oocytes mitochondria during the meiotic maturation from control or heart transplants mice .

Our research demonstrated that: (1) the global profiles of H4K5 and H4K8 acetylation in oocytes from heart transplants mice were altered during individual stages of meiotic maturation; (2) the distribution of oocytes mitochondria during the meiotic maturation has differences at MI stage .

Key words: Hesrt transplants , nouse oocytes , mitochondria , histone acetylation

目 录

摘 要	I
Abstract	II
第一章 绪论	1
1.1 器官移植排斥反应及移植后疾病概述	1
1.2 生殖细胞系的起源	6
1.3 卵子发生	6
1.4 卵母细胞与线粒体	8
1.5 卵母细胞与组蛋白修饰	12
第二章 实验材料与方法	15
2.1 实验动物	15
2.2 实验试剂与仪器	15
2.2.1 实验试剂	15
2.2.2 主要仪器	16
2.3 实验小鼠心脏移植	16
2.3.1 实验分组	16
2.3.2 小鼠颈部异位心脏移植方法（改良套管法）	16
2.4 心脏移植术后卵母细胞的获取	18
2.4.1 生发泡期卵母细胞（GV stage oocytes）的获取	18
2.4.2 第一次减数分裂中期卵母细胞（Metaphase I stage oocytes）的获取	18
2.4.3 第二次减数分裂中期卵母细胞（Metaphase II stage oocytes）的获取	18
2.5 卵母细胞线粒体荧光探针标记	18
2.6 卵母细胞免疫荧光染色	19
2.7 统计学分析	19
第三章 实验结果及讨论	21

3.1 实验结果	21
3.1.1 心脏移植小鼠卵母细胞核心组蛋白关键赖氨酸位点的乙酰化水平研究	21
3.1.2 心脏移植小鼠卵母细胞中线粒体分布的研究	23
3.2 讨论	25
3.2.1 免疫荧光结果的分析	25
3.3 本研究的创新性与局限性	27
第四章 结论与展望	29
4.1 结论	29
4.2 展望	29
附 录	31
附 录 1 缩略语表	31
附 录 2 本研究中自备试剂的配制	32
参 考 文 献	34
致 谢	44
攻读硕士学位期间科研成果	45

Table of Contents

Abstract	II
Chapter1 Introduction	1
1.1 Summary of organ transplantation and Postoperative disease	1
1.2 Origin of Germ cell	6
1.3 Oogenesis	6
1.4 Oocytes and Mitochondria	8
1.5 Oocytes and Histone modification	12
Chapter2 Materials and Methods	15
2.1 Animals	15
2.2 Agents and equipments	15
2.2.1 Drugs and agents	15
2.2.2 Equipments	16
2.3 Mouse heart transplants	16
2.3.1 Experimental groups	16
2.3.2 Method of mouse cervical heterotopic transplants	16
2.4 The retrieval of oocytes of heart transplants mice	18
2.4.1 The retrieval of fully grown GV stage oocytes	18
2.4.2 The retrieval of Metaphase I stage oocytes	18
2.4.3 The retrieval of Metaphase II stage oocytes	18
2.5 MitoTracker Mitochondrion-Selective Probes	18
2.6 Immunofluorescence	19
2.7 Statistical Analysis	19
Chapter 3 Results and discussions	21
3.1 Results	21
3.1.1 Global profiles of H3\H4 acetylation in heart transplants oocytes	21

3.1.2 Mitochondrial distribution in heart transplants	23
3.2 Discussions	25
3.2.1 The analysis of Confocal results	25
3.3 The novelty and restrictions of the research	27
Chapter 4 Conclusion and prospect	29
4.1 Conclusion	29
4.2 Prospect	29
Appendices	31
Appendix 1 List of abbreviated words	31
Appendix 2 The preparations of the agents provided by ourselves	32
Reference	34
Acknowledgement	44

第一章 绪论

1.1 器官移植排斥反应及移植后疾病概述

器官移植术后会发生两种结果：宿主抗移植物反应(host versus graft reaction , HVGR)或移植物抗宿主反应(graft-versus-host reaction, GVHR), 而我们通常所说的移植排斥反应是指前者(Nakatsuji T , 1991)。在临床上, 器官移植开展得越来越多, 技术也越来越成熟, 然其成败主要还是依赖于诱导移植后的耐受状态和抑制移植排斥反应的发生, 后者主要取决于供体来源组织的基因型, 依此可以将器官移植分类为: 自体移植/同系移植、同种异基因移植、异种移植等(Morris PJ, 2004)。自体移植多是自体的组织、细胞移植, 如自体植皮手术(皮肤移植)、自体血液回输术等, 一般不会发生排斥。同种异基因型移植在临床开展最为广泛, 应用潜力较大, 但还是易发生急性和慢性排斥反应(Wang YL, Tang ZQ, Gao W, et al, 2003), 单克隆抗体(如人源化抗 IL-2 受体单克隆抗体, Zenapax)联合应用免疫抑制剂如环孢素 A (Cyclosporin A, CsA)、雷帕霉素(Rapamycin, RAPA)、他克莫司(Tacrolimus, FK506)、芬戈莫德(Fingolimod, FTY720) (Millar AJ, Gupte GL, 2007; Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, et al, 2010)、吗替麦考酚酯(骁悉, Mycophenolate mofetil, MMF) (Matsumoto, Yuji Hof, et al, 2002)等方案可以明显缓解排斥反应。异种移植难度大, 排斥反应最为迅速、剧烈, 患者往往会发生移植物快速失功或者全身多器官功能障碍等结果而令人失望(Blakely ML, Vander Wed WJ, Berndt MC, et al, 1994)。目前所有种类的移植都面临一些移植后的问题, 比如移植后特别是使用免疫抑制剂后会诱使感染、肿瘤等症状的发生。究其原因, 主要有二: 首先, 手术创伤本身对机体免疫功能有一定破坏; 再者, 器官移植术前术后均需要使用一些抗排斥药物治疗方案, 如 CsA 、 FK506 、 RAPA 、 MMF 、 FTY720 的联合使用等, 对自身免疫系统有一定的破坏或者抑制(Sánchez Fueyo A, 2005)。移植研究也一直在致力于解决这些问题所导致的严重后果。

我们知道同种异基因器官移植获得成功的关键就是应用免疫抑制剂预防和治疗排斥反应, 在免疫抑制被发现以前, 人们已经开始尝试器官移植, 经过很多年的努力和实践, 器官移植外科技术基本完善与成熟。然而, 当时的科学发展有

限，人们对免疫抑排斥的认识不足，所以人们并没有找到移植失败的真正原因，直到有医师做了临床移植病例的报道，如 20 世纪 50 年代初，人类首次实施了 1 例同种异基因肾移植手术，但病人只存活了 1 个月；而 1954 年，美国医师报道了 1 例同卵双胞胎之间成功的实施肾移植手术并长期存活，人们才认识到了同种个体之间的相互排斥是导致器官移植失败的原因。既然找到了原因，人们就开始了这种排斥的研究，而免疫抑制剂的研究也就从此兴起。但是免疫抑制剂的发展却不是十分的顺利。1951 年有科学家证明可的松能延长兔的异体移植皮肤的存活时间，之后又发现 6-巯基嘌呤具有明显的免疫抑制作用。有了这一发现，人们开始大量的运用泼尼松等药物来抑制器官移植产生的排斥反应，也取得了很好的效果，不过巯基嘌呤和糖皮质激素类的药物毒副作用较大，手术后病人的长期存活会受到药物本身的影响，导致了免疫抑制剂的运用出现了危机。到了 20 世纪 70 年代初期，人们又发现了一种从土壤真菌中分离而来的环多肽药物-环孢素 A (CSA) 具有明显的免疫抑制作用。之后在进行了全面的药理学研究后。其迅速的被运用于临床，使人的肾存活率由之前的 40%-50% 提高到 80%-90%，器官移植的抗免疫排斥进入了 CSA 时代。由于 CSA 的良好效果，人们开始研究作用机制与它相类似的他克莫司 (FK506)，FK506 药效更强而毒副作用更小，但是肾毒性还是比较明显。在这之后，以雷帕霉素、霉酚酸酯 (Mycophenolate Mofetil, MMF) 为代表，抑制免疫细胞增殖和扩增的新一代免疫抑制剂兴起，并且他们与第二代制剂有协同作用。还有就是以抗 IL-2 受体单克隆抗体、FTYZO 等为代表的另一类免疫抑制剂，主要作用是抑制 TH1、增强 TH2 等。常见的免疫抑制剂分类如下表 1 所示。

表 1 常见免疫抑制剂分类

糖皮质激素
小分子药物
免疫亲和素结合药物
神经钙蛋白抑制剂
环孢素亲免疫素结合药物:环孢素、ISA247
FKBP12 结合药物: FK506、FK506 缓释剂
雷帕霉素靶点抑制剂:西罗莫司、依维莫司
核苷酸合成抑制剂
嘌呤合成(IMPDH)抑制剂:霉酚酸酯、肠衣霉酚酸、咪唑立
嘧啶合成(DHODH)抑制剂:来氟米特、FK778
抗代谢药物:硫唑嘌呤、MMF, Mizoribine and Brequinar sodium

鞘氨醇 212 磷酸受体拮抗剂: FTY720

蛋白质药物

清除性抗体(针对 B 细胞、T 细胞或者两者兼清除)

多克隆抗体:马、兔的抗胸腺球蛋白

鼠源性抗 CD23 抗体(莫罗单抗 2CD3)

人源化抗 CD52 抗体(阿仑单抗)

B 细胞耗竭性抗 CD220 单克隆抗体(利妥昔单抗)

非清除性抗体和嵌合蛋白

人源化/嵌合的单克隆抗 CD25 抗体(达珠单抗,巴利昔单抗)

自然粘合属性的嵌合蛋白: CTLA243/Ig (LEA29Y)

静脉注射丙种球蛋白

本研究的预实验部分选择了它克莫司 Tacrolimus 腹腔注射来初步了解免疫抑制剂是否会对卵母细胞的数量和质量产生影响, 因此我们详细的了解一下 FK506。FK506 是继 CSA 后又一个真菌产生的免疫抑制剂, 是 1984 年从土壤放线菌 *Streptomyces Tsukubanesis* 发酵产物中分离出的一种 23 元环的大环内酯类抗生素。FK506 的化学结构虽然与 CSA 不同, 但作用机制相似, 主要是选择性的抑制 Th 细胞, 阻断 IL-2 释放。FK506 有较强的选择性抑制作用表现在它: (1) 不抑制 T 细胞受体识别抗原; (2) 不影响经细胞膜的信号传递; (3) 抑制 mRNA 转录各种淋巴因子, 但不抑制丝裂原诱导的蛋白质合成; (4) 可显著减少主要组织相容性受体基因产物的表达; (5) 高浓度时对抗原提呈细胞功能有抑制作用。FK506 的细胞内受体为“FK506 结合蛋白”(FK binding protein, FKBP), 分子量为 12000, 它与“环孢素结合蛋白”(Cyclophilin) 均有肽-脯氨酸-顺式-反式-酶(PPIase)活性, FK506 与此酶结合后, 通过阻滞 PPIase 的活性来抑制 IL-2 等细胞因子的基因转录, 从而发挥其免疫抑制作用。实验资料显示, FK506 对混合淋巴细胞反应(MLR)和 IL-2 抑制的 IC₅₀ 较 CSA 强 100 倍左右, 口服 FK506, 每日 1mg/kg 的效果相当于 CSA10~20mg/kg。FK506 的血药浓度采用 ELISA 双抗体夹心法测定。口服后吸收迅速, 达峰时间为 1~2 小时, t_{1/2} 为 5~8 小时, 经肝脏代谢后排出体外, 排泄物中原形 FK506 少于 1%。临床主要应用于器官移植, 以防止排斥反应。对肝移植的效果优于环孢素, 也可用于心脏、肾和胰移植。但要注意的两种药物的更替时机, 特别是环孢素 A 改用他克莫司时, 因为二者毒副作用会相加, 会对肝肾功能造成损伤。其不良反应与 CSA 相似, 以肾毒性为主, 此外可见高血脂、高血糖、高血压、心绞痛及神经毒性(震颤、疼痛、失

眠)等。

随着药学的发展,人们在药物的使用上面更加的严谨和科学。通常免疫抑制剂的运用不会单独使用一种,而在过去的二十年里,免疫抑制方案也在不断的改进,由最初的免疫抑制蛋白诱导,到三联药物——神经钙蛋白抑制剂,二线药物(Aza, MMF)和糖皮质激素——维持治疗;随后同样药物低剂量适应后维持治疗。现在的许多种联合,包括对激素和神经钙蛋白抑制剂依赖程度降低的多种方案也已经出现。值得说明的是,免疫抑制剂的运用之所以考虑联合用药是为了达到最大的治疗效果和产生最小的毒副作用。随着新的免疫抑制药物数量的增长,有前景的药物组合数目也相应的急速增长,虽然还是会缺少充分的临床试验以确定有效剂量、安全性和有效性。。目前,药品生产的厂商并不是不愿意支持大规模的组合研究,而在临床上对所有的新药组合进行测试从财力和实际操作上来讲都是不可能的,那么,作为临床前评价新药的一部分,继续用实验移植模型进行药物组合的研究有着实际的需要。另外,除了联合用药之外,明确损伤机制有助于更合理的使用免疫抑制剂。这需要要有经验的研究者长期随访观察各种移植的变化并采取相应措施,如对所谓的移植物功能恶化、“慢性排斥反应”进行正确的诊断,明确排斥反应为 T 细胞介导还是抗体介导、基础肾脏病复发、药物毒性和感染等,更应分清楚移植物新近出现的恶化是源于新的损害,还是早期损伤的严重后果。将排斥反应分为 T 细胞介导和抗体介导的试验会改变治疗,应用基因芯片技术对活检肾组织基因表达进行分析有助于对排斥反应的进一步认识和分型。免疫反应监测也将广泛应用于临床,指导移植患者免疫抑制治疗,如同对高脂血症患者进行血脂监测指导降脂治疗一样。对抑制自身抗体反应的相关研究已引起重视。越来越多的证据显示自身抗体与晚期移植物功能恶化有关。既往认为存在自身抗体、ABO 血型不合是移植禁忌证,现在也可行器官移植。措施包括优化基础免疫抑制治疗、利妥昔单抗、静脉注射免疫球蛋白和血浆置换,但仍需发展新的手段。

药学高速的发展,药物基因学作为一门学科应运而生。它使免疫抑制剂治疗个体化成为可能,主要用于治疗窗较窄的毒性药物,这无疑又为降低药物的毒副作用提供了途径。CYP3A 细胞色素 P45023A 等位基因 CYP3A53 1,可以增加 CYP3A 表达, 70% ~80% 黑人携带 CYP3A5 3 1,仅 5%~10% 白人携带此基因。CYP3A5 基因型可以预测 FK506 靶浓度低和早期排斥反应,指导黑人肾移植免疫

抑制治疗,以减少排斥反应。

对于组织相容性抗原(HLA)不相容的器官移植绝大部分患者目前尚无可行的免疫抑制方案以获得真正的免疫耐受。真正的免疫耐受是:诱导既往暴露于抗原、免疫功能正常的宿主产生持续的同种抗原特异性无应答。临床唯一的途径是干细胞移植。稳定适应状态依赖于免疫抑制和对免疫系统的损伤。在某种程度上,免疫抑制剂为致免疫耐受,免疫抑制剂撤除后免疫耐受并不持久。事实上,最初的报道免疫抑制药物命名为“药物诱导免疫耐受”。许多“免疫耐受的临床试验”应为用免疫抑制剂建立宿主 2 移植物适应。

总之,随着近年来对移植免疫认识的深入,在免疫抑制剂上取得了很大的进步,给临床医生提供了越来越多的选择,但是令人满意的免疫抑制剂和免疫抑制方案还需不断探索。对未来免疫抑制剂美好远景是:既能保持移植物长期存活,又能维持患者健康。

谈了这么多免疫抑制剂的发展与运用,我们进行预实验也发现 FK506 对卵母细胞的数量及质量没有产生显著的影响,结合所查的文献,认为可能器官移植术本身是会对卵母细胞造成一系列影响的。那么器官移植到底是否会对生殖系统产生影响呢?移植后免疫排斥反应的发生对生殖细胞的功能影响如何呢?免疫抑制剂对于生殖细胞影响怎样呢?面对临床上需要施行器官移植却又未生育或者需要再生育的患者,我们需要考虑这些问题。郑军华的研究回答了第二个问题,他们研究证实临床治疗剂量的雷公藤多甙(一种中药免疫抑制剂)对肾移植患者的生殖系统有影响,男性表现为精子数量减少和活力下降,女性表现为月经不调和周期延长甚至闭经(郑军华, 闵志廉, 邱仙化等, 1995)。另外,石炳毅课题组的动物研究显示,雷公藤多甙对雄性大鼠的睾丸组织有不同程度的损害,雌性大鼠的黄体部分萎缩,卵巢部分颗粒细胞核膜消失,滑面内质网扩张,线粒体发生肿胀伴有基质变淡、嵴短小等现象,致使细胞呈现空泡化(钱叶勇, 石炳毅, 梁春泉等, 2002)。至于移植本身对生育的影响,我们检索文献发现却鲜有报道。

本课题采用心脏移植模型小鼠检测卵母细胞的相关变化来初步探讨上述问题。小鼠异位心脏移植模型是器官移植免疫模型的经典模型之一,主要包括颈部、腹部异位模型(Chen ZH, 1991)。颈部异位心脏移植是 Chen 于 20 年前创建,此后经多位研究者改进,成功率不断提高。颈部模型具有诸多优点,操作方便、便于观

察、结果稳定、损伤较小、并发症发生率小等(Aupperle H, Garbade J, Ullmann C, et al, 2007)。依据血管吻合方法不同,又可以分成血管缝合法和套管法,我们实验室采用是改良术式的套管法颈部异位心脏移植,术后血管通透性好,血管内皮损伤小且血栓不易发生,整个手术过程科学合理,供心缺血损伤时间我们控制在 15 分钟以内(4℃条件下),手术总耗时较少(56±10 分钟),总体而言成功率高(本实验室成功率达 90%左右,质控性良好)。文献对小鼠同种异基因心脏移植物的存活期报道平均为 7 天左右,与本实验室的数据 6.8±0.7 天相近(Wang Yz, Qin Q, Chen Jb, 2009)。同系移植(类自体移植)文献报道心脏移植存活期大于 100 天,本实验室数据为>120 天。通过观察并触摸心脏移植植物停跳,即认为排斥反应发生,故而在术后第七天取受体鼠检测卵细胞形态和各项功能。

1.2 生殖细胞系的起源

生殖细胞起源于胚胎早期就已产生的原生殖细胞,而原生殖细胞起源于表胚层(Falconer and Avery, 1978)。原生殖细胞最早出现在原肠期胚胎中,存在于后羊膜褶区域的胚外中胚层中,后经过迁徙,进入生殖嵴中,生殖嵴与原生殖细胞共同构成未分化的生殖腺,局部的生殖腺环境对生殖细胞的分化具有很大的影响。原生殖细胞迁移入生殖嵴后存在两种发育潜能,最初的决定因素是生殖腺中的体细胞组织。在早期性腺中,迁移而来的原生殖细胞进入周围的“雌性”皮质层和内部的“雄性”髓质。在雄性中,由于性别决定区 Y 基因 *sry* 的表达,可能抑制了卵巢的形成而启动了睾丸的分化,原生殖细胞发育成精子。在雌性中,由于 XX 无 Y 染色体,也就没有 *sry* 基因的影响,性腺选择性发育成卵巢,原生殖细胞发育成卵原细胞(Gubbay et al, 1990)。

1.3 卵子发生

卵子发生需要经过增殖期、生长期和减数分裂期。尽管卵子发生和精子发生都需要经过减数分裂,但是它们也有不同的地方。精子发生产生的配子,实际上就是一个“会运动的细胞核”,而由卵子发生产生的配子却包含着启动发育和维持代谢所必需的全部元件。由此可知,卵子发生的过程除了形成单倍体的核外,还

要建立一个由各种酶、RNA、细胞器等组成的复杂重要的细胞质体系。必须重视的是，卵母细胞自身产生 RNA 和核糖体；而储存能量和物质的卵黄蛋白和卵黄脂却是由某些体细胞合成。

卵子发生过程（图 1）（叶创新，2006）中，首先是卵原细胞经有丝分裂，增殖形成初级卵母细胞，初级卵母细胞经过两次减数分裂，当然减数分裂是不均等的分裂过程，最终只形成一个成熟的卵母细胞，其余以极体的形式排出。卵细胞一般呈圆形，细胞中卵黄物质的储存是不对称的。在发育过程中，卵母细胞的内部结构是非均向发展的，即不对称发展，生物学上称为具有极性。这种所谓的极性表现在卵母细胞的细胞核一般不位于中心位置，而是在细胞外周近表面区域，极体就是从这里排出的。减数分裂中排出极体的一极通常称为动物极，之后发育形成动物的器官组织。而与之相对的另一极叫做植物极，在发育后期将形成原肠。每个卵母细胞都处于卵泡中，被多层颗粒细胞所包裹，最邻近的一层卵丘细胞具有很多突起，与卵母细胞形成连接复合体，包括进行代谢物转运的缝隙连接，这种连接即使在透明带形成后仍然维持(Greve et al, 1985)。透明带是由生长的卵母细胞合成并积累的一种细胞外基质，可以使颗粒细胞与卵母细胞逐渐分离开，也有着保护卵母细胞和维持其正常生长的作用。另外，卵母细胞的减数分裂前期十分长，足以使卵母细胞充分生长。

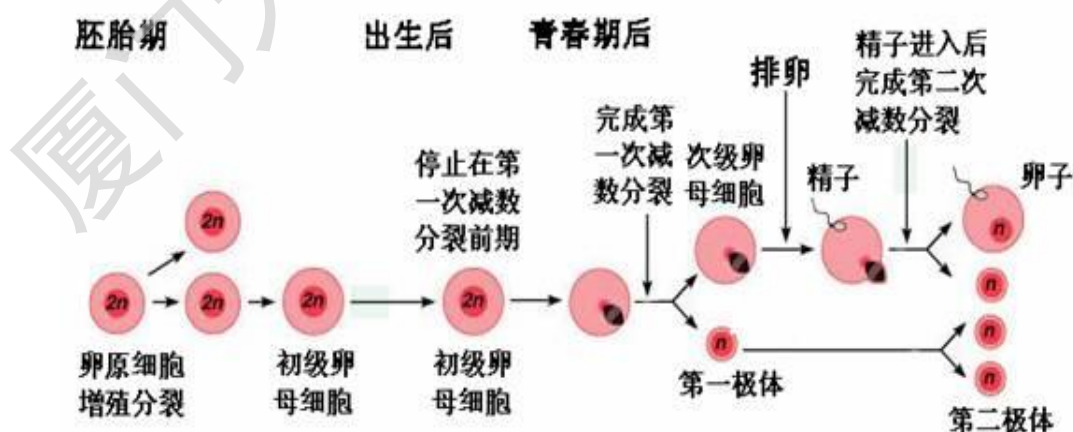


图 1 卵子发生过程

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库